



Conception d'un laboratoire sur fibre pour l'analyse in vivo

Karim Vindas, Elodie Engel, Thierry Livache, Patrick
Patrick.Garrigue@enscbp.Fr Garrigue, Stéphane Arbault, Neso Sojic, Loic
Leroy

► To cite this version:

Karim Vindas, Elodie Engel, Thierry Livache, Patrick Patrick.Garrigue@enscbp.Fr Garrigue, Stéphane Arbault, et al.. Conception d'un laboratoire sur fibre pour l'analyse in vivo. 7ème Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation, Jan 2016, Saint-Nazaire, France. hal-01280219

HAL Id: hal-01280219

<https://hal.science/hal-01280219>

Submitted on 29 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Conception d'un laboratoire sur fibre pour l'analyse *in vivo*

Karim Vindas^{1,2,3}, Elodie Engel^{1,2,3}, Thierry Livache^{1,2,3}, Patrick Garrigue⁴,
Stephane Arbault⁴, Neso Sojic⁴ et Loic Leroy^{1,2,3}

¹Univ. Grenoble Alpes, INAC-SPrAM, F-38000 Grenoble, France

²CNRS, SPrAM, F-38000 Grenoble, France

³CEA, INAC-SPrAM, F-38000 Grenoble, France

⁴Univ. Bordeaux, Institut des Sciences Moléculaires, CNRS UMR5255, Bordeaux-INP,
Pessac, France

elodie.engel@ujf-grenoble.fr

Abstract (Design of a lab on fiber for *in vivo* analysis)

This work presents the proof of concept of the detection of optical index changes by surface plasmon resonance (SPR) thanks to optical fiber bundles. This proof of concept is the first essential step for the future design of a lab on fiber tool dedicated to molecular analysis for endoscopic diagnosis. Our approach is based on nanotextured optical fiber bundles comprising several thousands of individual optical fibers. These nanostructures were coated by a thin gold layer in order to exhibit interesting optical properties like SPR. The sensitivity of the bundle to optical index changes and the detection limit were measured in retro-reflection. We performed numerical simulations in order to enhance these performances based on an optimization of the fiber end geometry and the gold coating thickness. We finally obtained a detection limit of 10^{-4} refractive index unit, which is fully compatible with the detection of biological interactions involving large proteins or bacteria.

1. Introduction

Le diagnostic médical s'appuie essentiellement sur l'analyse de nombreux paramètres biochimiques. Ces analyses sont faites en première intention sur des échantillons biologiques accessibles tels que les fèces, l'urine, la salive ou le sang. Cependant, pour certaines pathologies, la détermination des désordres biochimiques n'est pas suffisante et il est nécessaire d'analyser le site même du dysfonctionnement, au niveau de l'organe. Dans ce cas, il est possible de faire appel à plusieurs techniques telles que les rayons X, les échographies, l'imagerie par résonance magnétique, l'endoscopie... Malheureusement, la description anatomique des tissus n'est pas toujours suffisante pour établir un diagnostic pertinent. Il est alors nécessaire de pratiquer des biopsies. Les échantillons prélevés sont analysés au niveau cytologique et biochimique. Ce procédé particulièrement invasif prend du temps ce qui a pour conséquence de retarder les traitements.

Dans le domaine de l'endoscopie, l'efficacité de cette méthode d'observation pourrait être significativement améliorée si on réalisait des tests biochimiques en simultané avec l'imagerie des tissus. A ce jour, aucun outil capable d'une telle performance n'existe. Notre objectif est de concevoir un tel outil, capable, à terme, de réaliser des analyses biologiques multiplexées, à distance, *in vivo*, en temps réel et sans marquage. La première étape de ce projet, décrite dans cet article, a été de montrer qu'il était possible de détecter en rétro-réflexion des

variations d'indice optique par résonance des plasmons de surface (SPR) à l'aide de faisceaux de fibres optiques.

2. Principe physique de l'expérience

Plusieurs géométries de biocapteurs SPR sur fibre optique monocœur sont répertoriées dans la littérature [1] y compris l'analyse en rétro-réflexion [2]. Notre approche est basée sur l'utilisation d'assemblages de fibres optiques nano-structurées (Figure 1A, 1B) (par exemple, 6000 fibres optiques de diamètre de cœur égal à $3\text{ }\mu\text{m}$ peuvent être regroupées dans un assemblage de $350\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre [3]). Structurées et couvertes d'une fine couche d'or ou de nanoparticules d'or, ces fibres présentent d'intéressantes propriétés plasmoniques. En injectant la lumière par l'extrémité non nanostructurée, les guides optiques permettent la propagation jusqu'à l'extrémité dorée. La lumière est alors partiellement transmise, réfléchi et absorbée. Les proportions relatives des différents phénomènes sont modulées par le couplage avec les plasmons de surface (Figure 1C, 1D). Comme l'indice optique du milieu immédiatement environnant les pointes influence fortement ce couplage, la proportion de lumière réfléchi permet la détection d'infimes variations de l'indice de réfraction du milieu. Dans cette configuration, chaque fibre de l'assemblage se comporte comme un détecteur individuel basé sur la résonance des plasmons de surface (détecteur SPR).

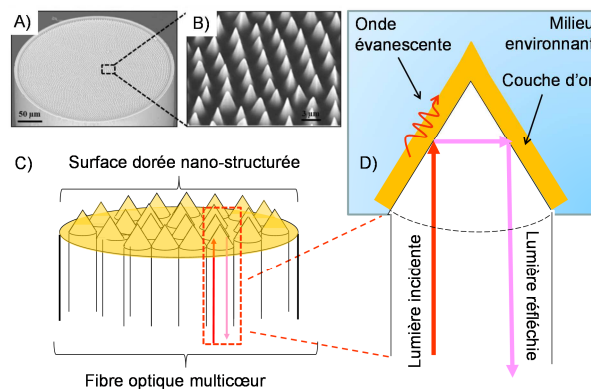


Figure 1 : A) et B) Image MEB (Microscope Electronique à Balayage) d'une fibre optique multicœur présentant des pointes à l'une de ses extrémités ; C) Représentation d'une extrémité de fibre multicœur nanostructurée et recouverte d'une couche d'or ; D) Représentation schématique du phénomène de SPR se produisant à la pointe d'une fibre individuelle dorée.

3. Matériel et méthodes

3.1 Nano-structuration des fibres et caractérisation

Le matériel de départ consiste en un assemblage, un faisceau de fibres optiques comprenant environ 6000 fibres individuelles ayant un cœur d'approximativement $3\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre (Figure 1A). Les nanostructures ont été produites sur l'une des extrémités de l'assemblage par gravure humide [3]. Il est possible de produire différents motifs 3D :

micro/nano-puits, nano-pointes, micro-piliers, etc. De tels systèmes offrent deux atouts : tout d'abord l'ensemble des fibres est nanostructuré en une seule opération. De plus, chaque pointe est intrinsèquement positionnée à l'extrémité de chaque guide. L'ensemble donne un dispositif fortement multiplexable, qui optimise dans une configuration simple, le transport du rayonnement d'excitation et la collecte du signal rétro-réfléchi par le même canal optique.

Afin de produire les micro-nanostructures les plus sensibles, il est possible d'optimiser leurs aspects (pointes ou cylindres (Figure 2), de hauteur et d'angle au sommet variable) en ajustant les temps et les compositions des solutions de gravure chimique.

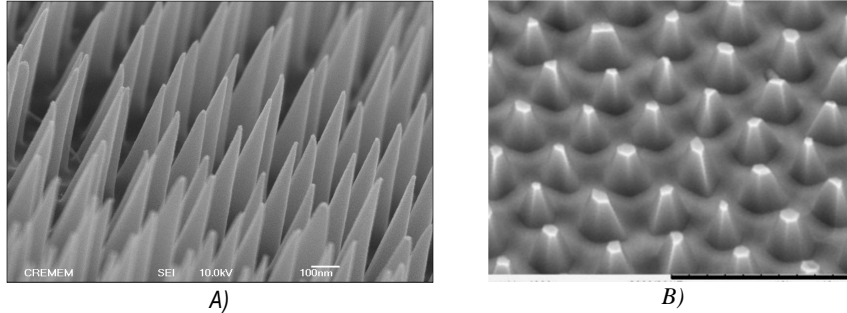


Figure 2 : Images MEB de A) Pointes formées sur l'assemblage de fibres optiques et B) Pointes tronquées formées sur l'une des faces de la fibre.

3.2 Métallisation des fibres

Une couche d'or a été déposée avec un évaporateur à canon à électrons. Pour adapter le processus à la géométrie cylindrique des fibres, un porte échantillon a été fabriqué permettant la rotation de l'échantillon pendant la métallisation. L'épaisseur de la couche d'or déposée a été mesurée avec une microbalance à quartz intégrée à l'évaporateur.

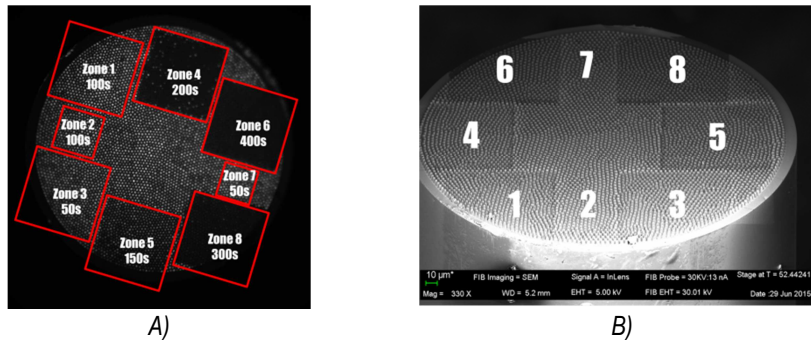


Figure 3 : A) Distribution des différentes zones d'attaque imagées en retro-réflexion et B) Image MEB de l'extrémité après attaque chimique.

Afin de limiter le nombre d'expériences requises pour déterminer l'épaisseur d'or optimale pour nos échantillons, nous avons utilisé un faisceau d'ions focalisé (FIB) pour moduler l'épaisseur d'or sur un même assemblage de fibres. On a donc tout d'abord déposé une couche épaisse d'or (300 nm) sur l'extrémité de la fibre. Des zones ont été abrasées de manière différentielle grâce au faisceau d'ions. Ceci nous a permis de définir un gradient d'épaisseurs allant jusqu'à l'abrasion complète de l'or. Sur la Figure 3, on observe la

distribution des différentes zones selon le temps d'attaque. Cette méthodologie nous a permis de converger rapidement vers l'épaisseur optimale.

3.3 Banc optique d'analyse

Nous avons réalisé un dispositif optique permettant d'imager et de quantifier la lumière rétro-réfléchie en bout de fibre (Figure 4). Ce dispositif a permis de caractériser la sensibilité et les limites de détection des fibres de l'assemblage. Le principe de la mesure est le suivant : de la lumière est injectée d'un côté de l'assemblage (côté non nano-structuré, non doré) et se propage jusqu'à l'extrémité dorée. Une camera CCD image la face d'entrée de la fibre multicœur et mesure en temps réel l'intensité rétro-réfléchie par chacun des cœurs. Cela résulte en l'imagerie en temps réel de milliers de détecteurs SPR indépendants. Polariseur et analyseur sont utilisés pour supprimer les réflexions sur la face d'entrée de l'assemblage.

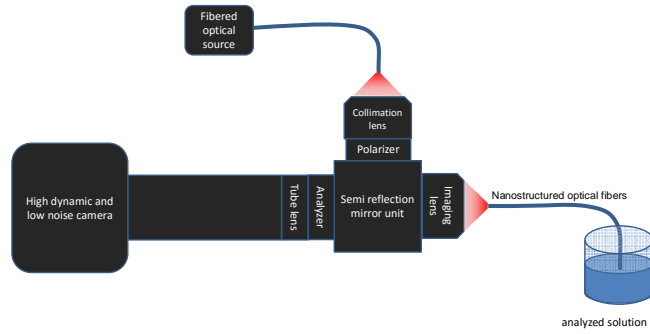


Figure 4 : Représentation du dispositif expérimental.

3.4 Analyse des images

Pour chaque solution correspondant à un indice optique différent, on enregistre plusieurs images dans le but de réduire le bruit photonique (Figure 5). On recalc ensuite la série d'images et on procède à l'analyse des sensibilités.

On mesure ultérieurement, pour une zone, la sensibilité s du capteur qui est définie comme la variation d'intensité mesurable au niveau du capteur pour une variation unitaire d'indice de réfraction (RIU pour *Refractive Index Unit*).

$$s = \frac{\Delta I}{\Delta n} \quad (1)$$

La courbe de la Figure 5 montre que chaque changement d'indice est traduit par un saut de l'intensité rétro-réfléchie (palier). Pour caractériser l'efficacité du système, on détermine la plus petite variation d'indice de réfraction σ_{RI} détectable par le capteur. En notant σ le bruit sur une série d'images :

$$\sigma_{RI} = \frac{3\sigma}{s} \quad (2)$$

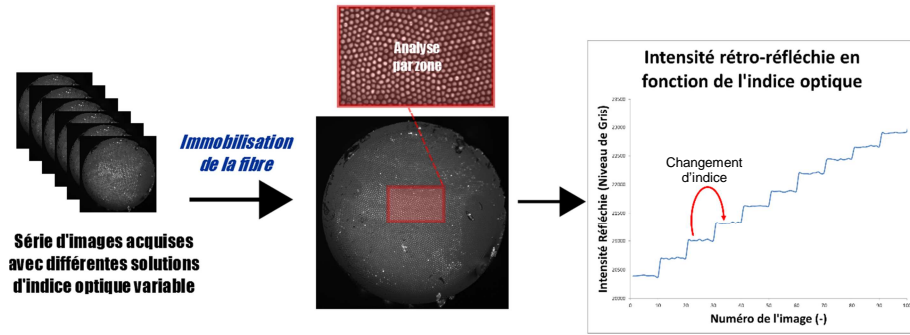


Figure 5 : Principe d'analyse des images. De gauche à droite : acquisition des images (10 images par indice optique), sélection d'une zone à analyser après recalage du paquet d'images, graphique représentant l'intensité rétro-réfléchie en fonction du numéro de l'image.

3.5 Simulations

Afin de limiter le nombre de conditions, de géométries à tester et à concevoir, nous avons réalisé des simulations avec le logiciel libre de calcul scientifique Scilab dans le but de trouver les valeurs des paramètres donnant les meilleures sensibilités. L'amélioration des limites de détection peut être faite en optimisant plusieurs paramètres tels que : la forme des extrémités des fibres par la gravure, l'épaisseur et la qualité de la couche d'or déposée et la longueur d'onde d'excitation.

4. Résultats

4.1 Simulations

Nous cherchons à optimiser nos géométries pour pouvoir détecter des molécules de faible poids moléculaire et en faible concentration.

4.1.1 Principe de la simulation

Notre approche numérique considère la valeur de la réflectance après des réflexions multiples des rayons méridionaux dans la fibre. Le modèle théorique est fondé sur les lois de l'optique géométrique [5].

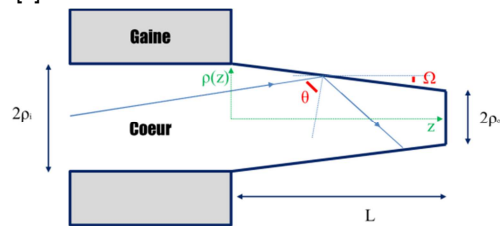


Figure 6 : Schéma des pointes utilisées

On nomme ρ_i et ρ_o les rayons respectifs du cœur et de l'extrémité de la fibre, L la longueur de la pointe et $\rho(z)$ le rayon de celle-ci qui varie linéairement suivant la coordonnée z . Dans

la fibre optique, la plage d'angles correspondant aux rayons guidés est $[\theta_{cr}, \frac{\pi}{2}]$, $\theta_{cr} = \sin^{-1} \frac{n_g}{n_c}$ est l'angle critique de la fibre, avec n_c et n_g les indices de réfraction du cœur et de la gaine, respectivement. Cette plage se transforme dans la région éfilée en $[\phi_1(z), \phi_2]$ en raison de la variation du rayon avec z . En notant Ω est le demi-angle du cône en extrémité :

$$\phi_1(z) = \cos^{-1} \frac{\rho_i \cos \theta_{cr}}{\rho(z)} - \Omega \quad (3)$$

$$\phi_2 = \frac{\pi}{2} - \Omega \quad (4)$$

Pour le calcul de la réflectance R_p , nous avons utilisé le formalisme matriciel dans un milieu multicouche [5]. L'excitation lumineuse est issue d'une source collimatée et injectée sur l'axe de la fibre dans la face clivée. La puissance transmise peut donc s'exprimer sous :

$$P(\theta) = \frac{n_1^2 \sin \theta \cos \theta}{(1 - n_1^2 \cos^2 \theta)^2} \quad (5)$$

Chaque rayon guidé subit un nombre de réflexions $N(\theta, z)$ au niveau de la pointe tel que :

$$N(\theta, z) = \frac{L}{2\rho(z) \tan(\theta + \Omega)} \quad (6)$$

Finalement on exprime la puissance réfléchie normalisée sous la forme :

$$P = \frac{\int_0^L dz \int_{\phi_1}^{\phi_2(z)} R_p^{2N(\theta, z)} \frac{n_1^2 \sin \theta \cos \theta}{(1 - n_1^2 \cos^2 \theta)^2} d\theta}{\int_0^L dz \int_{\phi_1}^{\phi_2(z)} \frac{n_1^2 \sin \theta \cos \theta}{(1 - n_1^2 \cos^2 \theta)^2} d\theta} \quad (7)$$

4.1.2 Simulation de fibres cylindriques

Nous avons simulé des extrémités cylindriques et fait varier leur hauteur pour une épaisseur d'or de 50 nm tout en fixant les autres paramètres géométriques (Figure 7). On observe que la sensibilité dépend fortement de la longueur d'onde d'excitation et de la hauteur du cylindre. Sur chaque courbe le pic d'absorption se décale vers les faibles longueurs d'ondes lorsque L augmente. La sensibilité (pente du pic d'absorption) est influencée par L : elle augmente entre $L = 5 \mu\text{m}$ et $L = 160 \mu\text{m}$ et diminue pour des valeurs de L trop importantes (0.8 mm).

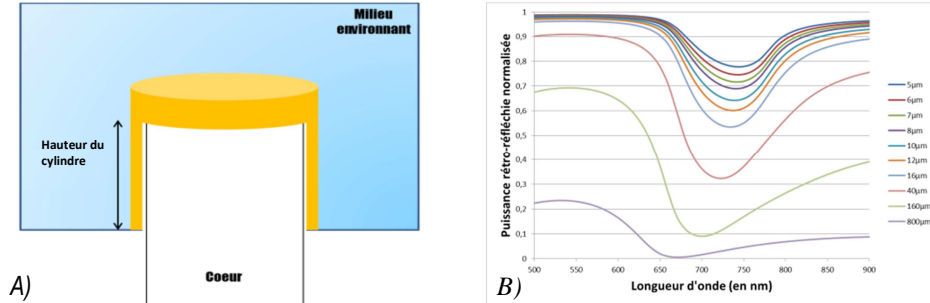


Figure 7 : A) Schéma de l'extrémité simulée. La hauteur paramétrée correspond à la hauteur du cylindre. B) Spectre de réflexion pour différentes hauteurs de cylindre. La simulation a été réalisée avec une couche d'or de 50 nm et un indice de milieu de 1,333.

Cette simulation nous a permis de déterminer les gammes de longueurs d'onde adaptées pour obtenir des sensibilités importantes et de constater qu'il est possible de trouver des pics d'absorption pour des hauteurs de cylindre compatibles avec les caractéristiques de nos fibres optiques multicœur.

4.2 Résultats expérimentaux

La Figure 8 montre la variation typique d'intensité rétro-réfléchie en fonction des variations de l'indice optique du milieu sur une zone de l'assemblage. La sensibilité pour une gamme d'indices entre 1.33 et 1.35 est égale à 4.3×10^4 niveaux de gris (NG) par RIU avec une bonne linéarité (coefficient de détermination égal à 0.9969). Le bruit se situe autour de 3NG ce qui nous donne une résolution de 2×10^{-4} RIU. Lorsqu'on se rapproche de l'indice du glycérol (1.435-1.473), on perd quasiment un facteur 5 sur la sensibilité de détection, qui est alors de 9.0×10^3 NG/RIU.

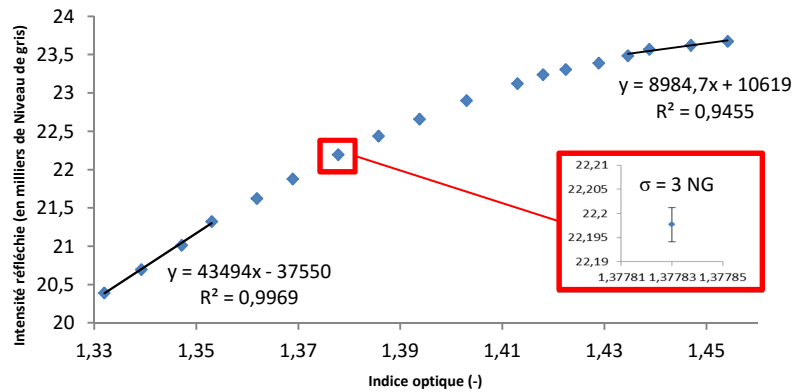


Figure 8 : Détermination de la sensibilité d'un assemblage de fibres optiques multicœur : variation de l'intensité de la lumière réfléchie en fonction de l'indice optique du milieu environnant les pointes pour une zone de l'assemblage multicœur

Cet assemblage de fibres est donc assez sensible pour détecter des variations d'indices de l'ordre de 10^{-4} , suffisantes pour envisager une détection biologique (les résolutions des appareils commerciaux sont autour de 10^{-5} pour les dispositifs de SPR classique sur prisme mais peuvent atteindre 10^{-7} [4]).

5. Conclusion et perspectives

Afin d'optimiser les paramètres d'élaboration de nos sondes nous avons développé une stratégie de modélisation qui prend en compte les aspects géométriques et optiques de l'assemblage de fibres. Ces simulations permettent, pour une géométrie donnée, de déterminer les gammes de longueurs d'onde adaptées pour obtenir des sensibilités importantes. Elles ont également permis de déterminer des caractéristiques géométriques (longueur des pointes) qui améliorent la sensibilité de nos fibres optiques multicœur. Cependant, les géométries qui présentent les meilleures performances ne sont pas toujours compatibles avec notre assemblage de fibres, raison pour laquelle il faut faire un compromis

entre performance et faisabilité. Il faut également être conscient que, pour correspondre aux optimums de la simulation, la maîtrise du processus de fabrication est indispensable. Nous travaillons actuellement à corréliser au mieux les résultats expérimentaux avec les simulations.

Les assemblages de fibres développés offrent une bonne sensibilité sur une grande plage d'indices de réfraction (1.33-1.45) et présentent une résolution de 2×10^{-4} RIU. Cette résolution devrait être suffisante pour détecter des interactions avec de grosses protéines (anticorps) ou des bactéries.

Nous allons par la suite effectuer des analyses biologiques multiplexées. Pour cela, nous mettrons à profit le caractère multicœur de nos dispositifs. Il nous faudra produire un réseau de différentes sondes biologiques à l'extrémité nano-texturée de l'assemblage afin de lui conférer les propriétés de reconnaissance spécifique. Ce réseau peut être produit en greffant des sondes par électro-polymérisation à l'aide de micro-leviers sur la surface dorée des fibres [7]. Nous envisageons à terme d'utiliser ce dispositif *in vivo* pour la détection multiplexée, à distance et sans marquage de cibles biologiques spécifiques en complexifiant progressivement de la détection de molécules d'intérêt ou de bactéries en solution [8] vers leur détection finale *in vivo*.

Remerciements

Ce projet est actuellement financé par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR Moly 2015 - ANR-15-CE19-0005-01).

Bibliographie

- [1] Sharma AK, Jha R, Gupta BD. Fiber-optic sensors based on surface plasmon resonance: a comprehensive review. *Sensors Journal, IEEE*. 2007, 7(8), 1118-1129
- [2] Hlubina P, Kadulova M, Ciprian D, Sobota J, Europ J. Reflection-based fibre-optic refractive index sensor using surface plasmon resonance. *Opt. Soc. Rep. Public*. 2014, 9, 14033-14038
- [3] Deiss F, Sojic N, White DJ, Stoddart P. Nanostructured optical fibre arrays for high-density biochemical sensing and remote imaging. *Anal. Bioanal. Chem*. 2010, 396 (1), 53-71
- [4] Karlsson, R, Stahlberg, R. Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities. *Analytical biochemistry*. 1995, 228(2), 274-280
- [5] Yuan Y, Hu D, Hua L, Li M. Theoretical investigations for surface plasmon resonance based optical fiber tip sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013, 188, 757-760
- [6] Gupta BD, Sharma AK. Sensitivity evaluation of a multi-layered surface plasmon resonance-based fiber optic sensor: a theoretical study. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2005, 107(1), 40-46.
- [7] Descamps E, Duroure N, Deiss F, Leichlé T, Adam C, Mailley P, Aït-Ikhlef A, Livache T, Nicu L, Sojic N. Functionalization of optical nanotip arrays with an electrochemical microcantilever for multiplexed DNA detection. *Lab on a Chip*. 2013, 13(15), 2956-296
- [8] Bouguelia S, Roupioz Y, Slimani S, Mondani L, Casabona MG, Durmort C, Vernet T, Calemczuk R et Livache T. On-chip microbial culture for the specific detection of very low levels of bacteria. *Lab on a Chip*. 2013, 13(20), 4024-4032